

Utjecaj oralnog nadomjestka karnozina tijekom visokoslane prehrane na izražaj gena antioksidativnih enzima u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora

Kovač, Lora

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:771949>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Lora Kovač

UTJECAJ ORALNOG NADOMJESTKA
KARNOZINA TIJEKOM VISOKOSLANE
PREHRANE NA IZRAŽAJ GENA
ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA U
KRVNIM ŽILAMA SPRAGUE-DAWLEY
ŠTAKORA

Diplomski rad

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Lora Kovač

UTJECAJ ORALNOG NADOMJESTKA
KARNOZINA TIJEKOM VISOKOSLANE
PREHRANE NA IZRAŽAJ GENA
ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA U
KRVNIM ŽILAMA SPRAGUE-DAWLEY
ŠTAKORA

Diplomski rad

Osijek, 2024.

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Zrinka Mihaljević

Neposredni voditelj: doc. dr. sc. Petar Šušnjara

Ovaj rad ima 25 listova, 1 tablicu i 7 slika.

ZAHVALE

Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Zrinki Mihaljević na ponovno ukazanom povjerenju, pruženom znanju, svim ispravicima i korisnim savjetima tijekom izrade rada.

Hvala neposrednom voditelju Petru Šušnjari i Nikolini Kolobarić za neizmjereno strpljenje i spremnost da odgovore na svako pitanje prilikom rada u laboratoriju.

Zahvaljujem i svojoj obitelji, bez čije potpore izrada rada ne bi bila moguća.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Utjecaj NaCl na organizam	1
1.2. Karnozin.....	2
2. HIPOTEZA.....	5
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	6
4. MATERIJAL I METODE	7
4.1. Ustroj studije	7
4.2. Životinjski model	7
4.3. Izolacija RNA.....	8
4.5. Priprema RNA za umnažanje i RTqPCR.....	9
4.6. Statistička obrada podataka.....	10
5. REZULTATI.....	11
5.1. Relativan izražaj superoksid dismutaze (<i>SOD</i>).....	11
5.2. Relativan izražaj glutation peroksidaze (<i>GPx</i>).....	13
5.2. Relativan izražaj katalaze (<i>CAT</i>).....	15
6. RASPRAVA	16
7. ZAKLJUČAK.....	18
8. SAŽETAK	19
9. SUMMARY	20
10. LITERATURA	21
11. ŽIVOTOPIS	25

Popis kratica

AGE	završni produkt uznapredovale glikacije
ALE	završni produkt uznapredovale lipoksidacije
ATP	adenozin trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i>)
CARNS1	karnozin-sintaza-1
CAT	katalaza
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>complementary DNA</i>)
CN1	karnozinaza-1 (tkivna)
CN2	karnozinaza-2 (serumska)
GPx	glutation peroksidaza
NAD(P)H	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NFW	voda bez nukleaza (engl. <i>nuclease free water</i>)
Nrf2	nuklearnieritroidni faktor 2
ROS	slobodni kisikovi radikali (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RTqPCR	engl. <i>quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SOD	superoksid dismutaza

1. UVOD

1.1. Utjecaj NaCl na organizam

Adekvatan unos natrija ključan je, između ostalog, za regulaciju osmotske ravnoteže, krvnog tlaka, prijenos živčanih impulsa i kontrakciju mišića (1, 2). Najveći prehrambeni izvor natrija je kuhinjska sol, natrijev klorid. Prema podacima Svjetske Zdravstvene Organizacije, za normalnu funkciju organizma optimalan unos natrija iznosi do 2 g, što je ekvivalentno 5 g kuhinjske soli (2). Bez natrija, nije moguć pravilan rad stanice, a s druge strane njegova prekomjerna konzumacija ima teške i dugotrajne negativne posljedice. Kuhinjska sol nalazi se u velikom broju namirnica, često u obliku konzervansa (1). Zbog toga, prekomjerna konzumacija soli postala je raširen problem. Prosječan unos kuhinjske soli dvostruko je veći od preporučenih vrijednosti (2). Najčešća negativna posljedica vezana uz prekomjerni unos soli je hipertenzija, no, čak i u slučajevima kada ne dolazi do povišenja srednjeg arterijskog tlaka, visok unos soli pokazuje štetan učinak na funkciju endotela (3, 4). Dugotrajna visokoslana prehrana dovodi do povećanog oksidativnog stresa na dva načina. Prvo, povećava nastanak slobodnih kisikovih radikala (ROS) aktivacijom nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaze (NAD(P)H oksidaze) (4). Kao i natrij, ROS imaju važnu ulogu u održavanju pravilne funkcije organizma. U fiziološkim uvjetima, imaju ulogu u signalizaciji faktora rasta, apoptozi i mitozu (5). ROS su izrazito nestabilni, zbog čega su prisutni kratko i u malim količinama. Ukoliko je njihova proizvodnja povećana, u cilju stabilizacije, vežu se za makromolekule, čime oštećuju ili u potpunosti onemogućavaju njihovu normalnu funkciju. Glavna meta ROS su proteini, koji u reakciji s radikalima tvore karbonilnu skupinu. Osim direktnog djelovanja, ROS indirektno ubrzavaju formaciju završnih produkata uznapredovale glikacije (AGE) i lipoksidacije (ALE) (6, 7). Uz povećanu proizvodnju ROS, visok unos soli smanjuje aktivnost antioksidativnih enzima što dodatno povećava disbalans između pro- i antioksidansa (3, 4, 5).

Prvu liniju obrane od ROS čini superoksid dismutaza (SOD). SOD je antioksidativni enzim koji katalizira reakciju između dva superoksidna iona i dva vodikova iona pri čemu nastaju molekula kisika i molekula vodikovog peroksida. Postoje tri oblika SOD (4). Superoksid dismutaza 1 (SOD1), najčešći je oblik SOD i u svom aktivnom mjestu sadrži ione bakra i cinka. Superoksid

dismutaza 2 (SOD2) u svom aktivnom mjestu ima mangan i većinom se nalazi u mitohondriju. Izvanstanična superoksid dismutaza ili superoksid dismutaza 3 (SOD3) također sadrži ione bakra i cinka, no uz njih sadrži i heparin vezujuću domenu pomoću koje se veže za proteoglikane u izvanstaničnom matriksu. Vodikov peroksid koji nastaje u reakciji sa SOD je također slobodni kisikov radikal, stoga je potrebna druga reakcija kako bi se preveo u manje štetan oblik. Katalaza (CAT) razlaže vodikov peroksid na kisik i vodu (8, 4). Zajedno sa SOD i CAT, na redukciju oksidativnog stresa djeluju glutation peroksidaze (GPx). GPx su skupina antioksidativnih enzima čija je uloga redukcija vodikovog peroksida i hidroperoksida, uključujući kompleksne lipidne hidroperokside. Glutation peroksidaza 1 (GPx1) zadužena je za reakciju s vodikovim peroksidom i niskomolekularnim hidroperoksidima, dok kompleksne lipidne peroksive može ukloniti glutation peroksidaza 4 (GPx4) (9).

Najučinkovitija metoda prevencije oksidativnog stresa izazvanog visokoslanom prehranom je smanjeni unos soli, no zbog uvriježenosti konzumacije slane hrane u populaciji taj proces je dugotrajan. Uz navike, u obzir treba uzeti i štetu koja je već nastala pretjeranom konzumacijom soli, stoga se istražuju alternativne metode koje mogu pridonijeti smanjenju njenog štetnog učinka.

1.2. Karnozin

Karnozin (β -alanil-L-histidin) je endogeni dipeptid izoliran iz mesa 1900. godine. Alkalnom hidrolizom izoliranog spoja utvrđeno je da je jedna od sastavnica novootkrivenog dipeptida histidin, nakon čega je iz razlike u empirijskoj formuli ukupnog spoja i histidina zaključeno kako je druga sastavnica β -alanin (10, 11, 12, 13). Zbog namirnice iz koje je izoliran, spoj je dobio naziv prema latinskoj riječi za meso, *caro* ili *carnis*. Karnozin je prisutan u svim tkivima, no najveće količine karnozina nalaze se u poprečno-prugastim mišićima. Osobe s većom mišićnom masom sadrže i veće količine karnozina, no čak i među sportašima, količina se razlikuje ovisno o tipu mišićnog vlakna koje je brojnije. Mišićna vlakna tipa II, koja su zaslužna za brze i snažne kontrakcije, sadrže veće količine karnozina od mišićnih vlakana tipa I (14, 15). Veće količine karnozina također se nalaze u srcu i mozgu (7, 14, 16).

Egzogeno uneseni karnozin apsorbira se u tankom crijevu putem peptidnih transportera koji su ovisni o protonima (17). Nakon ulaska u enterocite, mali dio karnozina se hidrolizira pomoću

karnozinaze-2 (CN2) uz prisutnost Mg^{2+} , dok većina odlazi u portalnu cirkulaciju. U serumu je prisutna karnozinaza-1 (CN1) koja razgrađuje većinu karnozina. Drugi organi također mogu hidrolizirati karnozin pomoću CN2 (7, 16, 18). Sinteza karnozina odvija se pomoću enzima karnozin-sintaze-1 (CARNS1) uz potrošnju ATP-a (10). Većina karnozina sintetizira se u mišićima i glija-stanicama mozga (7, 16). Histidin se u organizmu ne može sintetizirati *de novo*, njegovi izvori su prehrana i katabolizam proteina kao što je hemoglobin (7, 18). Iako je histidin esencijalna aminokiselina, ograničavajući faktor za sintezu karnozina nije dostupnost histidina, već njegove druge komponente, β -alanina (16, 18). β -alanin može biti sintetiziran u jetri, unesen prehranom ili dobiven katabolizmom određenih molekula koje uključuju aspartat, poliamine, pirimidine i koenzim A (16, 18, 19). U metabolizam karnozina uključena je i karnozin-N-metiltransferaza-1 koja prevodi karnozin u njegov metilirani analog, anserin. Omjer anserina i karnozina različit je ovisno o tkivu. Poprečno-prugasti mišići sadrže veću količinu karnozina, dok bubreg sadrži veće količine anserina. Osim anserina, u metilirane analoge karnozina ubraja se balenin. Metabolizam karnozina nije jednak kod svih organizama, što treba imati na umu prilikom izbora životinjskog modela za istraživanja. Primjerice, primati u serumu sadrže CN1, dok ona nije prisutna kod glodavaca (19). Raspodjela karnozina i njegovih analoga također se razlikuje. Mišići kopnenih sisavaca u najvećoj mjeri sadrže karnozin, uz manje količine anserina i balenina, dok morski sisavci i reptili sadrže veće količine balenina (7, 14).

Karnozin ima sposobnost kelacije prijelaznih metala, djeluje protuupalno, smanjuje oksidativni stres te inhibira karbonilaciju, glikozilaciju i agregaciju proteina (10, 12, 20). Svoj protektivni učinak, karnozin ostvaruje direktno i indirektno. Direktno djelovanje karnozina postiže se pomoću imidazolnog prstena histidina (21). On može reagirati s karbonilnim skupinama, tvoreći stabilnu kovalentnu vezu, što inhibira karbonilaciju šećera i lipida (7, 22). Također može ukloniti ROS donacijom vodika (18). Indirektno, karnozin aktivira Nrf2 signalni put koji potiče izražaj gena koji kodiraju antioksidativne enzime (7, 16, 21). Stanje nedostatka karnozina u krvi, karnozinemija, očituje se na različite načine ovisno o tkivu i razini oksidativnog stresa kojem je organizam izložen. Uloga karnozina povećana je u stanjima koja izazivaju oksidativni stres, u odnosu na fiziološke uvjete (19, 23). Kod miševa s nedostatkom *CARNS1*, nedostatak endogenog karnozina nema utjecaj na kontraktilnost mišića, iako se u njima nalazi u najvećim koncentracijama, što ukazuje na to da je prisutnost karnozina korisna, ali ne nužna u fiziološkim uvjetima (24). Isti nedostatak rezultira smanjenom funkcijom srca i kompenzatorno povećanom srčanom frekvencijom (24).

S druge strane, štakori s pojačanim izražajem *CARN1*, pokazali su atenuaciju ishemijsko-reperfuzijske ozlijede miokarda (19). Blagotvorni učinak karnozina primjećen je i kod osoba s kroničnim zatajenjem srca, kod kojih je nadomjestak karnozina poboljšao izdržljivost prilikom vježbanja i kvalitetu života (25).

Potrebe organizma za karnozinom mogu biti povećane zbog dobi, razine fizičke aktivnosti i načina prehrane. Hrana biljnog podrijetla siromašna je β -alaninom i histidinom, a uopće ne sadrži karnozin, što eliminira egzogeni unos karnozina, a može rezultirati smanjenom sintezom karnozina kod osoba na veganskoj i vegetarijanskoj prehrani. Kako bi se to spriječilo, potreban je povećan unos β -alanina, najčešće putem nadomjestaka prehrani (18). Suplementacija karnozinom najčešće se spominje u kontekstu sporta (10). Karnozin može direktno reagirati s protonima i na taj ih način ukloniti, zbog čega ima ulogu u regulaciji pH i bržem oporavku mišićnog umora (16). Razina karnozina opada s dobi, što smanjuje antioksidativni kapacitet tkiva i pridonosi porastu oksidativnog stresa, stoga je nadomještanje razine karnozina predloženo kao korisno za zdravo starenje (18, 25). Iako je pozitivan učinak karnozina općeprihvaćen, ne postoji ujednačen stav o tome koji način povećanja razine karnozina je najučinkovitiji. Najčešće se radi o direktnoj oralnoj suplementaciji karnozina ili, indirektno, njegovog ograničavajućeg prekursora, β -alanina, s ciljem povećanja endogene sinteze karnozina (16). Jedina potencijalna nuspojava suplementacije na ovaj način je blaga parestezija (16, 19). Zbog aktivnosti CN2, poluživot karnozina u humanom serumu je kratak (16). Konzumacija govedine u usporedbi s konzumacijom karnozina u obliku nadomjestka prehrani, pokazala je duže zadržavanje karnozina u serumu, što ukazuje na potencijalnu sposobnost određenih sastojaka u mesu da inhibiraju hidrolizu izazvanu CN2 (18). Na taj način veća količina karnozina dolazi do tkiva. Ipak, način pripreme hrane može utjecati na razinu karnozina u konačnom jelu, za razliku od nadomjestaka prehrani čija je količina karnozina unaprijed određena (26). U sva tri slučaja, pojačan unos karnozina i njegovih prekursora pokazao je pozitivan učinak na organizam.

Direktan učinak karnozina na oksidativni stres dobro je istražen, no molekularni mehanizmi kojima karnozin indirektno djeluje na aktivaciju drugih antioksidativnih čimbenika nisu u potpunosti razjašnjeni, što ostavlja prostor za nova istraživanja.

2. HIPOTEZA

Nadomjestak karnozina utjecat će na izražaj gena antioksidativnih enzima u aorti *Sprague-Dawley* štakora koji su izloženi visokoslanjoj prehrani.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj rada je odrediti učinak nadomjestka karnozina na izražaj gena antioksidativnih enzima (*SOD2*, *SOD3*, *GPx1*, *GPx4* i *CAT*) u uzorcima aorte *Sprague-Dawley* štakora izloženih visokoslanjoj prehrani u odnosu na skupinu koja nije izložena visokoslanjoj prehrani i kontrolnu skupinu koja nije izložena niti visokoslanjoj prehrani niti karnozinu.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Ustroj studije

Eksperimentalna studija na pohranjenim aortama pokusnih životinja (*Sprague-Dawley* štakori). Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Klasa: 641-01/24-01/04 Ur. Broj: 2158-61-46-24-32) te je provedeno u skladu s etičkim standardima Direktive 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe.

4.2. Životinjski model

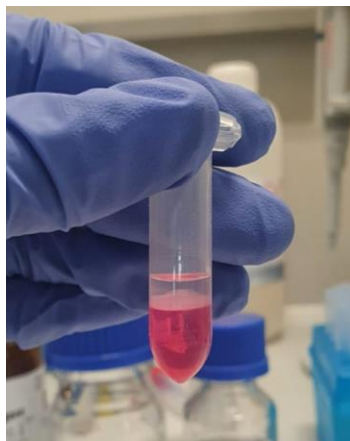
Za određivanje izražaja gena korištene su pohranjene aorte zdravih *Sprague-Dawley* štakora, oba spola, dobi 8 - 10 tjedana iz uzgoja Vivarija Medicinskog fakulteta Osijek (N = 21). Štakori su nasumično podijeljeni u jednu od četiri skupine (Tablica 1.) i po završetku jednotjednog protokola anestetizirani i anelgezirani kombinacijom midazolama (0,5 ml/kg) i ketamin-klorida (3 ml/kg). Pričekano je da anestetik počne djelovati, nakon čega su štakori žrtvovani dekapitacijom i izolirane su im krvne žile koje su smrznute tekućim dušikom i pohranjene na – 80 °C do izolacije RNA.

Tablica 1. Eksperimentalne skupine

Naziv skupine	Opis
CTRL	Kontrolna skupina na standardnoj prehrani (0,4 % NaCl) koja nije konzumirala nadomjestak karnozina (N = 5).
CTRL + CAR	Skupina koja je kroz sedam dana konzumirala oralni nadomjestak karnozina (150 mg/kg) (N = 4).
HSD	Skupina koja je kroz sedam dana izložena visokoslanjoj prehrani (4 % NaCl) (N = 6).
HSD + CAR	Skupina koja je izložena visokoslanjoj prehrani i konzumirala je nadomjestak karnozina (N = 6).
N označava broj štakora u skupini	

4.3. Izolacija RNA

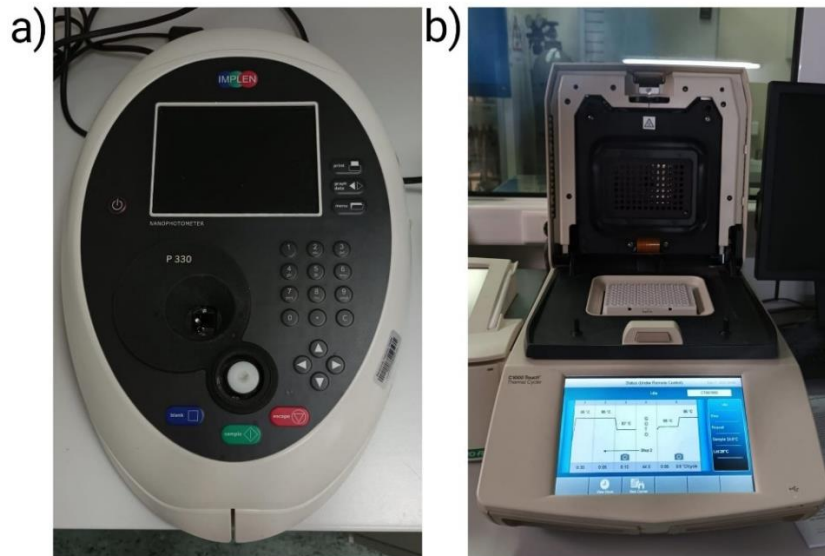
Svaki od pohranjenih uzoraka aorte prvo je mehanički usitnjen u tarioniku uz pomoć tekućeg dušika. Nakon što je odabrani uzorak usitnjen, u tarionik je dodan 1 ml TRIzol reagensa. Zbog toksičnosti korištenih reagensa, postupak izolacije proveden je u digestoru. Uzorak je maksimalno homogeniziran s TRIzol reagensom i nakon toga je sav sadržaj pipetom prebačen u Eppendorf tubicu u koju je dodano 100 μ l 1-brom-3-klor-propana. Uzorci su vorteksirani kroz 15-20 sekundi te ostavljeni na sobnoj temperaturi 8 minuta. Inkubirani uzorci su centrifugirani 15 minuta na 12000 rpm u centrifugi ohlađenoj na 4 °C što dovodi do odjeljivanja slojeva (Slika 1.). Tražena RNA nalazi se u supernatantu stoga je on odvojen u novu Eppendorf tubicu, pazeći da se pritom ne uzme sadržaj iz srednjeg sloja koji sadrži ostali stanični sadržaj. U odvojeni supernatant dodano je 500 μ l izopropanola. Slijedi lagano miješanje i ponovna inkubacija uzorka na sobnoj temperaturi u trajanju od 8 minuta. Uzorak je centrifugiran 8 minuta na 12000 rpm u ohlađenoj centrifugi. Izopropanol dovodi do precipitacije RNA koja je nakon centrifugiranja vidljiva kao bijeli želatinozni pelet na dnu Eppendorf tubice. Pipetom je pažljivo uklonjen sav tekući sadržaj, ostavljajući samo RNA precipitat. Za pročišćavanje uzorka, u tubicu je dodan 1 ml 75 %-tnog etanola. Nakon centrifugiranja od 5 minuta na 7500 rpm u ohlađenoj centrifugi, iz tubice je uklonjen etanol i postupak je ponovljen. Etanol je uklonjen pipetiranjem, a precipitat je ostavljen u otvorenoj tubici nekoliko minuta da zaostali etanol ishlapi. Dobivena RNA je resuspendirana u 30 μ l vode bez nukleaza (NFW, engl. *Nuclease free water*).



Slika 1. Izolacija RNA korištenjem TRIzola, Laboratorij za kliničku i molekularnu imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku (izvor: original autorice rada).

4.5. Priprema RNA za umnažanje i RTqPCR

Prije analize, potrebno je fotometrijski odrediti čistoću i koncentraciju izolirane RNA te ujednačiti koncentraciju u svim uzorcima (Slika 2. a). Na uređaj je nanesen 1 μ l dobivenog izolata. Izmjerene koncentracije su ujednačene te je u svaki uzorak dodano NFW tako da je konačni volumen svakog uzorka 7 μ l. Zatim je u uzorak dodano 1 μ l DNAze i 1 μ l reakcijske smjese. Takav uzorak stavljen je na PCR uređaj (Slika 2. b). DNAzni postupak služi za pročišćavanje potencijalno zaostale DNA iz uzorka prije umnažanja. Na kraju se u uzorak dodaje 1 μ l STOP otopine koja prekida reakciju. Idući korak je korištenjem PCR uređaja iz izolirane RNA dobiti komplementarnu DNA (cDNA) koju je moguće umnožiti. Dobivanjem cDNA završen je postupak pripreme uzorka za određivanje izražaja gena. Pripremljena je nova reakcijska smjesa koja sadrži početnice za traženi gen, SYBR Green boju, DNA polimerazu, deoksiribonukleotide, ione magnezija i NFW. Za potrebe analize pripremljeno je 100 μ l otopine početnica razrijeđene pomoću NFW u omjeru 1:10. Na PCR pločice s 96 jažica dodano je 2,5 μ l uzorka cDNA i 7,5 μ l reakcijske smjese. Uzorak je ponovno stavljen na PCR uređaj za konačno umnažanje i analizu.



Slika 2. Oprema korištena za pripremu i umnažanje ciljanih gena. (a) Implen NanoPhotometer P330, Laboratorij za kliničku i molekularnu imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku (izvor: original autorice rada). (b) Bio-Rad Real Time PCR CFX96 uređaj, Laboratorij za kliničku i molekularnu imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku (izvor: original autorice rada).

Kao ciljani geni za umnažanje odabrani su *SOD2* (superoksid dismutaza 2), *SOD3* (superoksid dismutaza 3), *GPx1* (glutation peroksidaza 1), *GPx4* (glutation peroksidaza 4) i *CAT* (katalaza). Rezultati izražaja gena normalizirani su u odnosu na β -aktin, koji je odabran kao *housekeeping* gen zbog svog stabilnog izražaja u različitim uvjetima.

Tijekom svakog PCR ciklusa, cDNA u uzorku se razdvaja u jednolančani oblik temperaturnom denaturacijom na 95 °C. Na jednolančanu DNA može se vezati komplementarna početnica što se događa pri temperaturama između 40 °C i 60 °C, ovisno o početnici. Postupno povišenje temperature omogućuje produljivanje lanaca uz pomoć DNA polimeraze. Kada temperatura ponovno dostigne 95 °C, umnoženi lanci se razdvajaju i postupak se ponavlja kroz unaprijed određeni broj ciklusa. Nastala dvolančana DNA vizualizira se SYBR Green bojom koja se veže za mali utor DNA.

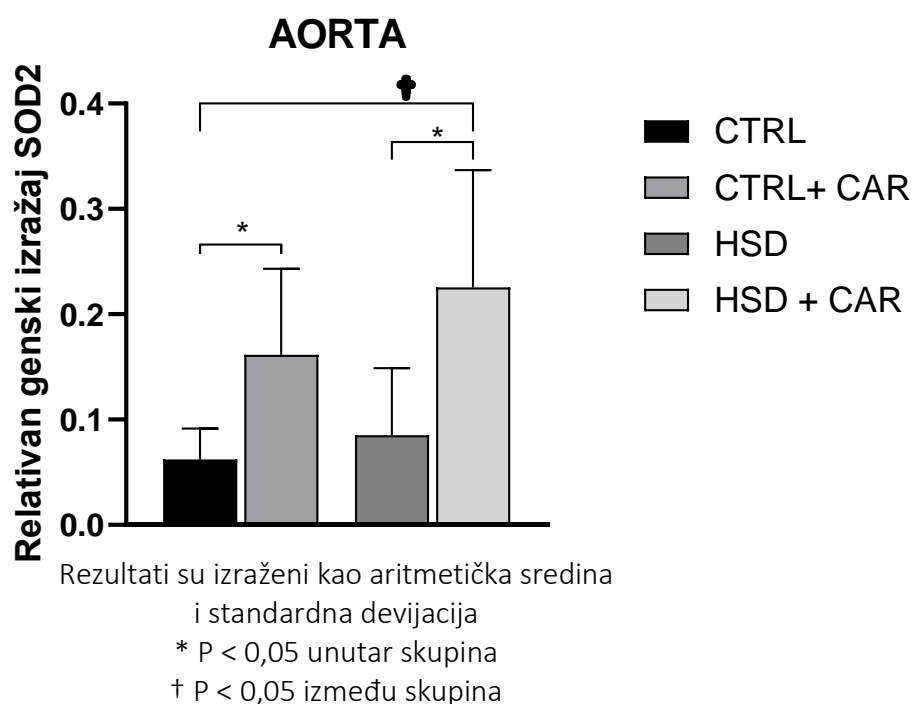
4.6. Statistička obrada podataka

Za prikaz rezultata, kao mjera centralne tendencije, odabrana je aritmetička sredina, uz standardnu devijaciju (SD), kao mjeru raspršenosti. Za statističku analizu i usporedbu rezultata relativnog izražaja proteina korišten je test za jednosmjernu analizu varijanci za nezavisne uzorke (One-Way ANOVA). Statističke analize provedene su korištenjem Graph Pad Prism6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) i Microsoft Excel 2016. (Microsoft Office 365, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Razina statističke značajnosti određena je s $P < 0,05$. Za grafički prikaz i analizu rezultata korišten je program GraphPad Prism6 (San Diego, CA, SAD). Za izračun veličine uzorka korišten je softver GPower v3.1.9.7 (Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Njemačka). Veličina Cohenovog d (Δ / SD) učinka određena je prema primarnom ishodu studije.

5. REZULTATI

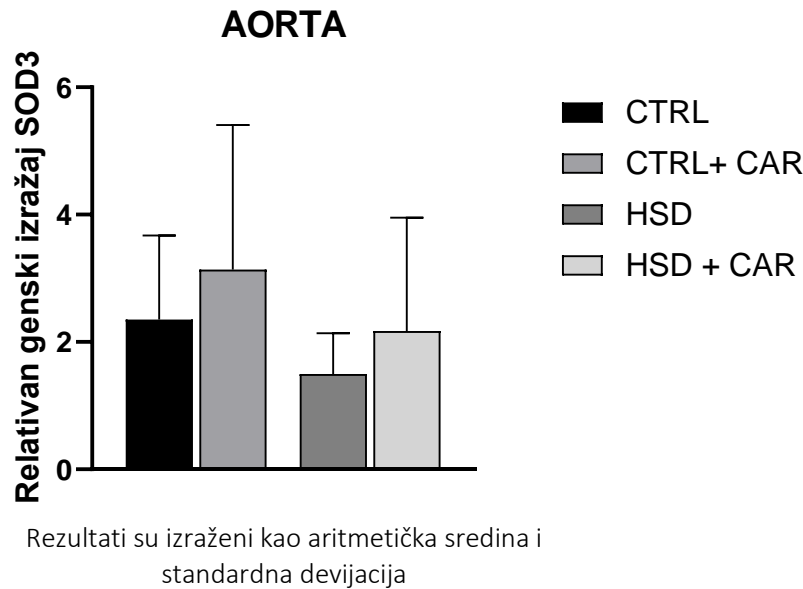
5.1. Relativan izražaj superoksid dismutaze (*SOD*)

Relativan izražaj *SOD2* značajno je povišen u CTRL + CAR skupini ($P = 0,04$) i u HSD + CAR skupini ($P = 0,01$) u odnosu na kontrolu. Također je povišen u HSD + CAR skupini ($P = 0,02$) u odnosu na HSD skupinu (Slika 3).



Slika 3. Relativan izražaj *SOD2* gena određen RTqPCR metodom u uzorcima aorte *Sprague-Dawley* štakora. Uzorci su podijeljeni u četiri skupine: kontrolna skupina koja nije izložena visokoslanjoj prehrani i oralnom nadomjesku karnozina (CTRL, $N = 5$), skupina koja je kroz sedam dana konzumirala oralni nadomjestak karnozina (CTRL + CAR, $N = 4$), skupina koja je kroz sedam dana izložena visokoslanjoj prehrani (HSD, $N = 6$) te skupina koja je kroz sedam dana izložena visokoslanjoj prehrani i konzumirala je oralni nadomjestak karnozina (HSD + CAR, $N = 6$) normalizacija izražaja je provedena prema izražaju gena za β -aktin, rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija; * $P < 0,05$ u usporedbi s CTRL i HSD skupinom unutar skupine, † $P < 0,05$ u usporedbi s CTRL skupinom između skupina, N predstavlja broj uzoraka.

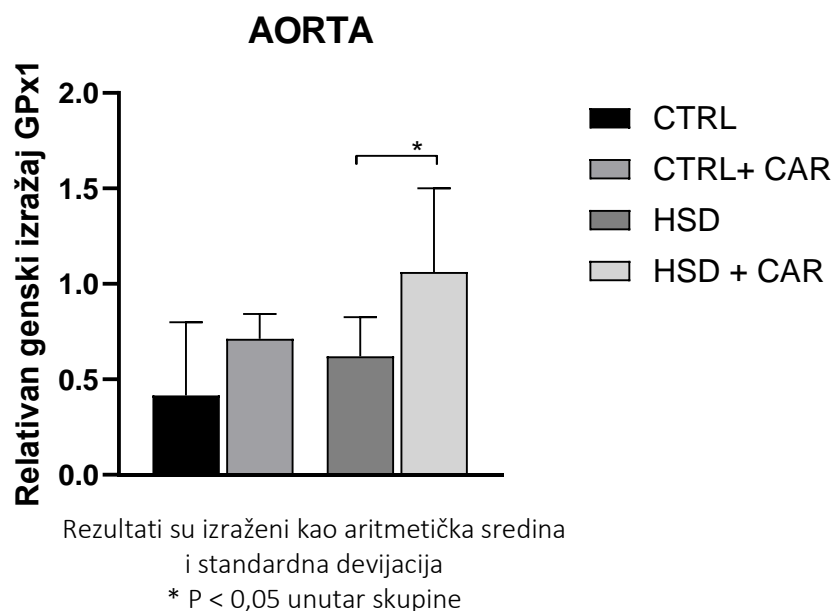
Relativan izražaj *SOD3* nije značajno povišen ni u jednoj od ispitivanih skupina u odnosu na CTRL ili HSD skupinu (Slika 4).



Slika 4. Relativan izražaj *SOD3* gena određen RTqPCR metodom u uzorcima aorte *Sprague-Dawley* štakora. Uzorci su podijeljeni u četiri skupine: kontrolna skupina koja nije izložena visokoslanjoj prehrani i oralnom nadomjesku karnozina (CTRL, N = 5), skupina koja je kroz sedam dana konzumirala oralni nadomjestak karnozina (CTRL + CAR, N = 4), skupina koja je kroz sedam dana izložena visokoslanjoj prehrani (HSD, N = 6) te skupina koja je kroz sedam dana izložena visokoslanjoj prehrani i konzumirala je oralni nadomjestak karnozina (HSD + CAR, N = 6) normalizacija izražaja je provedena prema izražaju gena za β -aktin, rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija; razina statističke značajnosti je određena s $P < 0,05$, N predstavlja broj uzoraka.

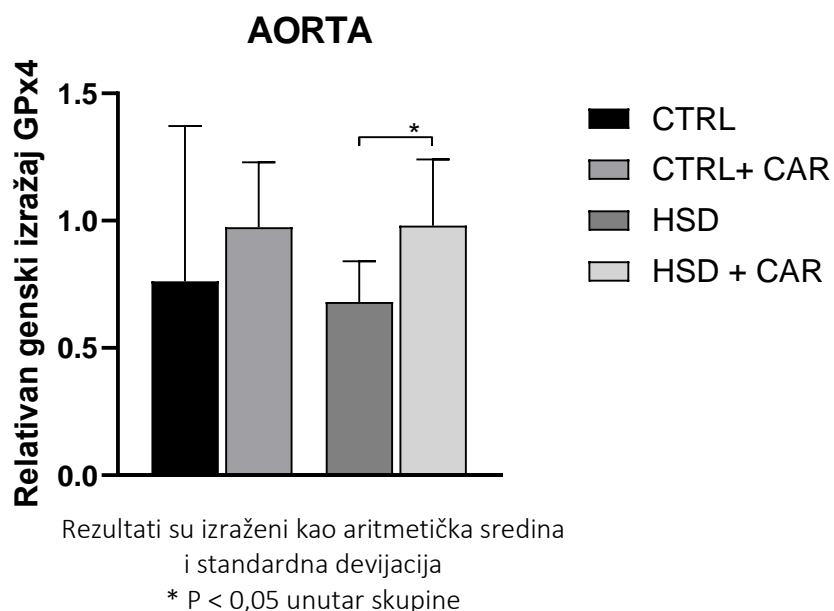
5.2. Relativan izražaj glutation peroksidaze (GPx)

Relativan izražaj *GPx1* značajno je povišen u HSD + CAR skupini ($P = 0,049$) u odnosu na HSD skupinu, dok u CTRL + CAR i HSD + CAR skupinama nema značajne razlike u odnosu na CTRL skupinu (Slika 5).



Slika 5. Relativan izražaj *GPx1* gena određen RTqPCR metodom u uzorcima aorte *Sprague-Dawley* štakora. Uzorci su podijeljeni u četiri skupine: kontrolna skupina koja nije izložena visokoslanjoj prehrani i oralnom nadomjesku karnozina (CTRL, $N = 5$), skupina koja je kroz sedam dana konzumirala oralni nadomjestak karnozina (CTRL + CAR, $N = 4$), skupina koja je kroz sedam dana izložena visokoslanjoj prehrani (HSD, $N = 6$) te skupina koja je kroz sedam dana izložena visokoslanjoj prehrani i konzumirala je oralni nadomjestak karnozina (HSD + CAR, $N = 6$) normalizacija izražaja je provedena prema izražaju gena za β -aktin, rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija; * $P < 0,05$ u usporedbi s HSD skupinom, N predstavlja broj uzoraka.

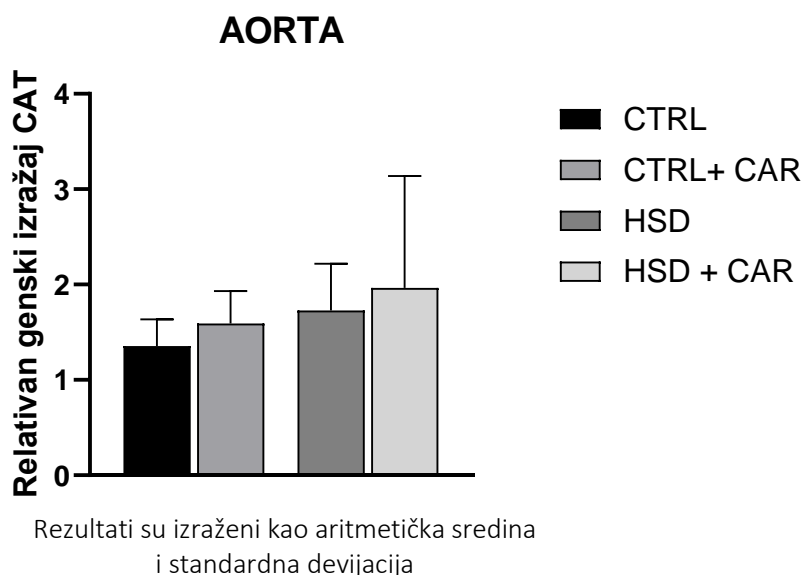
Relativni izražaj *GPx4* značajno je povišen u HSD + CAR skupini ($P = 0,04$) u odnosu na HSD skupinu, dok u CTRL + CAR i HSD+CAR skupinama nema značajne razlike u odnosu na CTRL skupinu (Slika 6).



Slika 6. Relativan izražaj *GPx4* gena određen RTqPCR metodom u uzorcima aorte *Sprague-Dawley* štakora. Uzorci su podijeljeni u četiri skupine: kontrolna skupina koja nije izložena visokoslojnoj prehrani i oralnom nadomjesku karnozina (CTRL, $N = 5$), skupina koja je kroz sedam dana konzumirala oralni nadomjestak karnozina (CTRL + CAR, $N = 4$), skupina koja je kroz sedam dana izložena visokoslojnoj prehrani (HSD, $N = 6$) te skupina koja je kroz sedam dana izložena visokoslojnoj prehrani i konzumirala je oralni nadomjestak karnozina (HSD + CAR, $N = 6$) normalizacija izražaja je provedena prema izražaju gena za β -aktin, rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija; * $P < 0,05$ u usporedbi s HSD skupinom, N predstavlja broj uzoraka.

5.2. Relativan izražaj katalaze (CAT)

Relativan izražaj CAT nije značajno promijenjen ni u jednoj od ispitivanih skupina u odnosu na CTRL ili HSD skupinu (Slika 7).



Slika 7. Relativan izražaj *CAT* gena određen RTqPCR metodom u uzorcima aorte *Sprague-Dawley* štakora. Uzorci su podijeljeni u četiri skupine: kontrolna skupina koja nije izložena visokoslanjoj prehrani i oralnom nadomjestku karnozina (CTRL), skupina koja je kroz sedam dana konzumirala oralni nadomjestak karnozina (CTRL + CAR), skupina koja je kroz sedam dana izložena visokoslanjoj prehrani te skupina koja je kroz sedam dana izložena visokoslanjoj prehrani i konzumirala je oralni nadomjestak karnozina (HSD + CAR) normalizacija izražaja je provedena prema izražaju gena za β -aktin, rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija; razina statističke značajnosti je određena s $P < 0,05$.

6. RASPRAVA

Prijašnja istraživanja o karnozinu suglasna su oko njegovog pozitivnog učinka na smanjenje oksidativnog stresa, no rezultati vezani za mehanizme kojima karnozin postiže traženi učinak nisu ujednačeni. Velik broj istraživanja potvrdio je pretpostavku da prisutnost karnozina sprječava smanjen izražaj i aktivnost antioksidativnih enzima. Primjerice, Özdoğan i sur. istražili su učinak karnozina na oksidativni stres izazvan doksorubicinom. Srčano tkivo ženki *Sprague-Dawley* štakora koje su konzumirale karnozin pokazalo je održanu aktivnost SOD, GPx te je spriječena inaktivacija CAT (8). Yan i sur. zamijetili su isti protektivni učinak na miševima koji su konzumirali oralni nadomjestak karnozina prije oštećenja jetre acetaminofenom (27). Rezzani i sur. proveli su istraživanje na L6 skeletnim mioblastima štakora koji su izloženi djelovanju vodikovog peroksida. Skupina koja je prije izlaganja peroksidu primila tretman karnozinom nije pokazala snižen izražaj *SOD2* i *CAT* za razliku od netretirane skupine (22). Prilikom promatranja učinka nadomjestka karnozina na mlade i stare *Wistar* štakore, Aydin i sur. uočili su pad SOD u skupini starijih, u odnosu na mlade štakore. Nakon suplementacije karnozinom razina SOD povišena je kod starih štakora, ali nije bilo učinka na mlade štakore (28). Takav rezultat može se pripisati niskoj razini oksidativnog stresa kod mladih zdravih štakora te naglašava ulogu karnozina u patološkim stanjima, u odnosu na normalne fiziološke uvjete. Karnozin u kontekstu slane prehrane proučili su Yang i sur., čije je istraživanje pokazalo povišene razine SOD i CAT u jetri *Dahl SS* štakora nakon suplementacije karnozinom (29).

Nije u svim istraživanjima u potpunosti postignut očekivani učinak. Devyatov i sur. istraživali su učinak predtretmana karnozinom na razinu antioksidativnih enzima nakon izazivanja ishemijsko/reperfuzijske ozlijede mozga kod *Wistar* štakora, pri čemu je uočena smanjena veličina infarkta u skupini koja je tretirana karnozinom, ali nije uočena promjena razine SOD, GPx i CAT (30). Istraživanje koje su proveli Stefani i sur. nije pokazalo značajan učinak na razinu antioksidativnih enzima kod *Wistar* štakora nakon zastoja srca, no primijećen je povoljan učinak na razinu lipoperoksidacije te protuupalni učinak. Izostanak značajnih promjena u razini antioksidativnih enzima moguć je zbog duge odgode administracije karnozina nakon ozljede, tijekom koje su se javili drugi kompenzatorni mehanizmi i završeno je remodeliranje srca (31). Povećanu aktivnost SOD i GPx također nisu primijetili Abbasoğlu i sur., u svom istraživanju

učinka karnozina na ishemijsko/reperfuzijski ozljedu testisa kod Wistar štakora, no zabilježene su snižene razine karbonila (32). Djelovanje karnozina na povišenje razine antioksidativnih enzima kompleksan je proces na koji utječe nekoliko faktora, između ostalog, dob, vrsta tkiva te razina oksidativnog stresa kojem je određeno tkivo izloženo.

Ovo istraživanje provedeno je sa svrhom određivanja učinka nadomjestka karnozina na izražaj gena antioksidativnih enzima u tkivu aorte nakon izlaganja oksidativnom stresu koji je izazvan visokoslanom prehranom. Značajno povećanje izražaja *SOD2*, *GPx1* i *GPx4* uočeno je u skupini koja je tijekom izlaganja visokoslanoj prehrani dobivala nadomjestak karnozina, u usporedbi sa skupinom koja je izložena samo visokoslanoj prehrani. Dobiveni rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima učinka nadomjestka karnozina na oksidativni stres izazvan visokoslanom prehranom, provedenim u Laboratoriju za kliničku i molekularnu imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek, tijekom kojih je uočena smanjena razina naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda, povišen antioksidativni kapacitet određen FRAP metodom te poboljšana relaksacija aortnih prstenova kod *Sprague-Dawley* štakora nakon suplementacije karnozinom uz visoki unos soli, što ukazuje na njegovu protektivnu ulogu u stanjima oksidativnog stresa (33, 34).

Iz svega navedenog možemo zaključiti da je karnozin potentni vaskularni antioksidans čiji antioksidativni učinak može biti posredovan i povećanjem izražaja antioksidativnih enzima. Za detaljnije zaključke potrebno je odrediti izražaj proteina i/ili aktivnost antioksidativnih enzima.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da nadomjestak karnozina značajno utječe na izražaj gena antioksidativnih enzima nakon povećanog unosa soli što pokazuje da antioksidativno djelovanje karnozina može biti posredovano povećanjem izražaja gena antioksidativnih enzima.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj diplomskog rada je odrediti učinak nadomjestka karnozina na izražaj gena antioksidativnih enzima u uzorcima aorte *Sprague-Dawley* štakora izloženih standardnoj i visokoslojnoj prehrani.

Nacrt studije: Eksperimentalna studija na pohranjenim aortama *Sprague-Dawley* štakora.

Materijal i metode: Zdravi *Sprague-Dawley* štakori oba spola (starosti 8-10 tjedana) nasumično su podijeljeni u četiri skupine: kontrolna skupina (CTRL, standardna prehrana s 0,4 % NaCl), skupina na visokoslojnoj prehrani (HSD, 4 % NaCl), skupina koja je konzumirala karnozin (CTRL + CAR, 150 mg/kg) te skupina na visokoslojnoj prehrani koja je konzumirala karnozin (HSD + CAR). Nakon jednotjednog protokola, štakori su anestetizirani i izolirani su uzorci aorte. Nakon ekstrakcije RNA, određen je relativni izražaj *SOD2*, *SOD3*, *GPx1*, *GPx4* i *CAT* uz korištenje β -aktina kao *housekeeping* gena.

Rezultati: Razina genskog izražaja *SOD2*, *GPx1*, i *GPx4* povišena je u HSD + CAR skupini. Izražaj *SOD2* također je povišen u CTRL + CAR skupini. Nije uočena značajna promjena izražaja *SOD3* i *CAT*. Buduća istraživanja mogu se usmjeriti na određivanje izražaja proteina te aktivnosti enzima kako bi se dodatno razjasnila uloga karnozina.

Zaključak: Primjena karnozina dovela je do povećanog izražaja gena antioksidativnih enzima tijekom visokoslane prehrane.

Ključne riječi: antioksidansi; karnozin; genski izražaj; natrijev klorid; oksidativni stres

9. SUMMARY

Influence of oral carnosine supplements during high-salt diet on antioxidative enzyme gene expression in blood vessels of *Sprague-Dawley* rats

Objectives: The study aimed to determine the impact of carnosine supplementation on relative expression of antioxidant enzyme genes in samples of rat aortas during a normal diet and a high-salt diet.

Study design: Experimental animal study using isolated blood vessels of *Sprague-Dawley* rats.

Material and methods: Healthy, male and female Sprague-Dawley rats (aged 8 - 10 weeks) were randomly divided into four groups: the control group (CTRL, standard 0,4 % NaCl diet), high-salt diet group (HSD, 4 % NaCl), group that was administered carnosine (CTRL + CAR, 150 mg/kg oral carnosine) and the high-salt diet group that was simultaneously given carnosine (HSD + CAR). After the one week long protocol, the rats were anesthetized, and samples of the aorta were taken. After RNA extraction, relative gene expressions of *SOD2*, *SOD3*, *GPx1*, *GPx4* and *CAT* were measured using RTqPCR, with β -actin as the housekeeping gene.

Results: In the HSD + CAR group, levels of *SOD2*, *GPx1* and *GPx4* expression were increased. *SOD2* was also elevated in the carnosine supplemented group that was fed a normal diet. No notable change was recorded in *SOD3* and *CAT* expression. Future research can be directed towards determining protein expression and enzyme activity to further clarify the role of carnosine.

Conclusion: Administration of carnosine led to an increase in relative expression of antioxidant enzyme genes during a high-salt diet.

Key words: antioxidants; carnosine; gene expression; oxidative stress; sodium chloride

10. LITERATURA

1. Patel Y, Joseph J. Sodium intake and heart failure. *International Journal of Molecular Sciences*. 13. prosinca 2020.;21(24):9474. doi:10.3390/ijms21249474
2. WHO. Sodium reduction [Internet]. World Health Organization; 2023. [citirano 12. svibnja 2024.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction>
3. Barić L, Drenjančević I, Mihalj M, Matić A, Stupin M, Kolar L, et al. Enhanced antioxidative defense by vitamins C and E consumption prevents 7-day high-salt diet-induced microvascular endothelial function impairment in young healthy individuals. *Journal of Clinical Medicine*. 20. ožujka 2020.;9(3):843. doi:10.3390/jcm9030843
4. Su Q, Yu X-J, Wang X-M, Li H-B, Li Y, Bai J, et al. Bilateral paraventricular nucleus upregulation of extracellular superoxide dismutase decreases blood pressure by regulation of the NLRP3 and neurotransmitters in salt-induced hypertensive rats. *Frontiers in Pharmacology*. 25. studeni 2021.;12. doi:10.3389/fphar.2021.756671
5. Kitiyakara C, Chabrashvili T, Chen Y, Blau J, Karber A, Aslam S, et al. Salt intake, oxidative stress, and renal expression of NADPH oxidase and superoxide dismutase. *Journal of the American Society of Nephrology*. studeni 2003.;14(11):2775–82. doi:10.1097/01.asn.0000092145.90389.65
6. Ghodsi R. Carnosine effect on advanced lipoxidation end-products: A brief review on tissues. *Current Pharmacology Reports*. 6. lipnja 2019.;5(4):214–8. doi:10.1007/s40495-019-00188-3
7. Solana-Manrique C, Sanz FJ, Martínez-Carrión G, Paricio N. Antioxidant and neuroprotective effects of carnosine: Therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Antioxidants*. 26. travnja 2022.;11(5):848. doi:10.3390/antiox11050848
8. Özdoğan K, Taskin E, Dursun N. Protective effect of carnosine on adriamycin-induced oxidative heart damage in rats. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi/The Anatolian Journal of Cardiology*. 1. veljače 2011.;11(1). doi:10.5152/akd.2011.003

9. Pei J, Pan X, Wei G, Hua Y. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxidation. *Frontiers in Pharmacology*. 2. ožujka 2023.;14. doi:10.3389/fphar.2023.1147414
10. Jukić I, Kolobarić N, Stupin A, Matić A, Kozina N, Mihaljević Z, et al. Carnosine, small but mighty—prospect of use as functional ingredient for functional food formulation. *Antioxidants*. 28. lipnja 2021.;10(7):1037. doi:10.3390/antiox10071037
11. Bezkorovainy A. Carnosine, carnitine, and Vladimir Gulevich. *Journal of Chemical Education*. listopad 1974.;51(10):652. doi:10.1021/ed051p652
12. Caruso G, Godos J, Castellano S, Micek A, Murabito P, Galvano F, et al. The therapeutic potential of Carnosine/anserine supplementation against Cognitive Decline: A systematic review with meta-analysis. *Biomedicines*. 4. ožujka 2021.;9(3):253. doi:10.3390/biomedicines9030253
13. Caruso G, Benatti C, Musso N, Fresta CG, Fidilio A, Spampinato G, et al. Carnosine protects macrophages against the toxicity of AB1-42 oligomers by decreasing oxidative stress. *Biomedicines*. 26. travnja 2021.;9(5):477. doi:10.3390/biomedicines9050477
14. Peters V, Yard B, Schmitt CP. Carnosine and diabetic nephropathy. *Current Medicinal Chemistry*. 23. travnja 2020.;27(11):1801–12. doi:10.2174/0929867326666190326111851
15. Łochyński D, Pawlak M, Everaert I, Podgórski T, Gartych M, Borucka A-M, et al. Motor unit fatigability following chronic carnosine supplementation in aged rats. *Nutrients*. 25. siječnja 2022.;14(3):514. doi:10.3390/nu14030514
16. Cesak O, Vostalova J, Vidlar A, Bastlova P, Student V. Carnosine and beta-alanine supplementation in human medicine: Narrative review and critical assessment. *Nutrients*. 5. travnja 2023.;15(7):1770. doi:10.3390/nu15071770
17. Son DO, Satsu H, Kiso Y, Shimizu M. Characterization of carnosine uptake and its physiological function in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *BioFactors*. siječanj 2004.;21(1–4):395–8. doi:10.1002/biof.552210177
18. Wu G. Important roles of dietary taurine, creatine, Carnosine, Anserine and 4-hydroxyproline in human nutrition and health. *Amino Acids*. 18. veljače 2020.;52(3):329–60. doi:10.1007/s00726-020-02823-6

19. Creighton JV, de Souza Gonçalves L, Artioli GG, Tan D, Elliott-Sale KJ, Turner MD, et al. Physiological roles of carnosine in myocardial function and health. *Advances in Nutrition*. 13. rujna 2022. (5):1914–29. doi:10.1093/advances/nmac059
20. Palin M-F, Lapointe J, Gariépy C, Beaudry D, Kalbe C. Carnosine prevents oxidative damage in myoblast cells derived from porcine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*. 5. prosinca 2019.;97(Supplement_3):59–59. doi:10.1093/jas/skz258.122
21. Aldini G, de Courten B, Regazzoni L, Gilardoni E, Ferrario G, Baron G, et al. Understanding the antioxidant and carbonyl sequestering activity of carnosine: Direct and indirect mechanisms. *Free Radical Research*. 11. prosinca 2020.;55(4):321–30. doi:10.1080/10715762.2020.1856830
22. Rezzani R, Favero G, Ferroni M, Lonati C, Moghadasian MH. A carnosine analog with therapeutic potentials in the treatment of disorders related to oxidative stress. *PLOS ONE*. 9. travnja 2019.;14(4). doi:10.1371/journal.pone.0215170
23. Calabrese V, Scuto M, Salinaro AT, Dionisio G, Modafferi S, Ontario ML, et al. Hydrogen sulfide and carnosine: Modulation of oxidative stress and inflammation in kidney and brain axis. *Antioxidants*. 18. prosinca 2020.;9(12):1303. doi:10.3390/antiox9121303
24. Gonçalves L de, Sales LP, Saito TR, Campos JC, Fernandes AL, Natali J, et al. Histidine dipeptides are key regulators of excitation-contraction coupling in cardiac muscle: Evidence from a novel Carns1 knockout rat model. *Redox Biology*. ožujak 2021.;44:102016. doi:10.1016/j.redox.2021.102016
25. Lombardi C, Carubelli V, Lazzarini V, Vizzardi E, Bordonali T, Ciccarese C, et al. Effects of oral administration of Orodispersible Levo-Carnosine on quality of life and exercise performance in patients with chronic heart failure. *Nutrition*. 31. siječnja 2015.;31(1):72–8. doi:10.1016/j.nut.2014.04.021
26. Menon K, Cameron JD, de Courten M, de Courten B. Use of carnosine in the prevention of cardiometabolic risk factors in overweight and obese individuals: Study protocol for a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *BMJ Open*. 13. svibnja 2021.;11(5). doi:10.1136/bmjopen-2020-043680

27. Yan S, Wu S, Yin M, Chen H, Chen H. Protective effects from Carnosine and histidine on acetaminophen-induced liver injury. *Journal of Food Science*. 1. listopada 2009.;74(8). doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01330.x
28. Aydın AF, Küçükgergin C, Özdemirler-Erata G, Koçak-Toker N, Uysal M. The effect of carnosine treatment on prooxidant–antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats. *Biogerontology*. 10. svibnja 2009.;11(1):103–9. doi:10.1007/s10522-009-9232-4
29. Yang P, Deng F, Yuan M, Chen M, Zeng L, Ouyang Y, et al. Metabolomics reveals the defense mechanism of histidine supplementation on high-salt exposure-induced hepatic oxidative stress. *Life Sciences*. veljača 2023.;314:121355. doi:10.1016/j.lfs.2022.121355
30. Devyatov AA, Fedorova TN, Stvolinsky SL, Ryzhkov IN, Riger NA, Tutelyan VA. The study of the neuroprotective effects of carnosine in the experimental model of focal cerebral ischemia/reperfusion. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 06. svibnja 2019.;13(1):55–9. doi:10.1134/s1990750819010050
31. Stefani GP, Capalonga L, da Silva LR, Heck TG, Frizzo MN, Sulzbacher LM, et al. Effects of aerobic and resistance exercise training associated with carnosine precursor supplementation on maximal strength and VO₂max in rats with heart failure. *Life Sciences*. 1. listopada 2021.;282:119816. doi:10.1016/j.lfs.2021.119816
32. Abbasoğlu L, Kalaz EB, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Beneficial effects of taurine and carnosine in experimental ischemia/reperfusion injury in testis. *Pediatric Surgery International*. 9. rujna 2012.;28(11):1125–31. doi:10.1007/s00383-012-3168-5
33. Zidar A. Učinak nadomjestka karnozina na razinu oksidativnog stresa kod Sprague-Dawley štakora na visokoslanjoj dijeti [Diplomski rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2023 [pristupljeno 13.05.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:432624>
34. Zidar M. Učinak nadomjestka karnozina na vaskularnu funkciju izoliranih aortalnih prstenova Sprague-Dawley štakora na visokoslanjoj dijeti [Diplomski rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2023 [pristupljeno 13.05.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:462668>

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Lora Kovač

Datum rođenja: 6. 6. 2000.

Mjesto rođenja: Osijek

Adresa: Osječka 169, 31207 Tenja

E-pošta: lora.kovac.a@gmail.com

Školovanje:

2007. – 2014. Osnovna škola Frana Krste Frankopana, Osijek

2014. – 2019. Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića, Osijek

2019. – 2022. Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostika na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2022. – 2024. Diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Stručne aktivnosti i publikacije:

Kovač, Lora; Đambić, Vedran; Šušnjara, Petar; Kibel, Aleksandar, Drenjančević, Ines; Mihaljević, Zrinka. Influence of Oxygen on Adenosine A1 and A2a Receptor Gene Expression in Cerebral Blood Vessels of Sprague-Dawley Rats // 4th International Student and 17th Bridges in Life Sciences Conferences / Prunchunas, Edward; Vari, Sandor G.; Laureova, Simona; Vladar, Csaba (ur.). Book of abstracts. 2022. str. 30-30 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).